



⑫ **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

⑲ Anmeldenummer: **93118251.3**

⑤① Int. Cl.⁵: **G01N 33/72, C07K 15/28**

⑳ Anmeldetag: **11.11.93**

③① Priorität: **17.11.92 DE 4238705**
31.03.93 DE 4310500

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
25.05.94 Patentblatt 94/21

⑥④ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL
PT SE

⑦① Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim(DE)

⑦② Erfinder: **Karl, Johann, Dr.**
Bert-Schratzleer-Strasse 7
D-82380 Peissenberg(DE)
Erfinder: **Finke, Andreas, Dr.**
Alte Münchner Strasse 9
D-82407 Wielenbach(DE)
Erfinder: **Engel, Wolf-Dieter, Dr.**
Aumillerstrasse 9A
D-82340 Feldafing(DE)

⑤④ **Simultane Bestimmung von HbA1c und Hämoglobinvarianten mit einer HbA1c-analogen Glykierung.**

⑤⑦ Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur immunologischen Bestimmung des Gehaltes an glykosyliertem Hämoglobin in einer Blutprobe, bei welchem man einen Antikörper verwendet, der HbA1_c, HbS1_c und HbC1_c erkennt, der in diesem Verfahren verwendete Antikörper sowie ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Antikörpers.

EP 0 598 329 A2

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur immunologischen Bestimmung des Gehaltes an glykiertem Hämoglobin in einer Blutprobe, bei welchem man Antikörper verwendet, die HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennen, sowie ein Verfahren zur Herstellung solcher Antikörper.

- 5 besteht aus vier Proteinketten, von denen jeweils zwei die gleiche Struktur haben. Überwiegend besteht es aus jeweils zwei nicht glykosylierten α - und β -Ketten. Das Hämoglobin liegt im Blut normalerweise zu mehr als 90 % in dieser als HbA₀ bezeichneten Form vor.

- Sowohl von der α - als auch von der β -Kette des Hämoglobins sind Varianten mit einer veränderten Aminosäuresequenz bekannt, die die Transportfunktion des Hämoglobinmoleküls beeinträchtigen und zu sogenannten Hämoglobinopathien führen. Bei der bekanntesten dieser Hämoglobinopathien, der Sichelzellanämie, ist in Position 6 der β -Kette die hydrophile Glutaminsäure durch das hydrophobe Valin ersetzt. Hierdurch kommt es zu einer hydrophoben "Zyklisierung" zwischen diesem Valin und dem Valin in Position 1 der β -Kette. Durch diese Struktur wird eine Aggregation der eine solche veränderte β -Kette enthaltenden HbS-Moleküle bewirkt, welche die Transportfunktion dieses veränderten Hämoglobins beeinflusst. Auch das HbC, ein anderes pathologisches Hämoglobin, unterscheidet sich vom HbA durch einen Aminosäureaustausch in Position 6 der β -Kette. In diesem Fall ist die Glutaminsäure durch Lysin ersetzt. Daneben sind noch eine Vielzahl weiterer Hämoglobinvarianten mit einem definierten Aminosäureaustausch bekannt (z.B. HbA₂, HbE).

- Von diesen Hämoglobinvarianten werden in vivo durch nicht enzymatische Reaktion mit Glucose 20 glykierte Hämoglobinderivate gebildet. Diese nicht enzymatische Glykierung ist eine langsam, kontinuierlich und irreversibel ablaufende Reaktion, die im wesentlichen von der Blutglucosekonzentration abhängig ist. Die Glykierung verläuft über die Bildung einer Schiff'schen Base zwischen der Aldehydgruppe der Glucose und der freien Aminosäure des Hämoglobins. Das hierbei gebildete Aldimin lagert sich durch eine Amadori-Umlagerung zum N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-Rest um. In dieser umgelagerten Form ist das glykierte 25 Hämoglobin stabil.

- Das üblicherweise entstehende glykierte Hämoglobin wird mit HbA_{1c} bezeichnet. Die oben genannten glykierten Hämoglobinvarianten werden mit HbS_{1c} oder HbC_{1c} bezeichnet. Diese entstehen durch Glykierung der freien Aminogruppe des Valin- bzw. Lysinrestes, der sich am N-terminalen Ende der β -Kette des Hämoglobins befindet. Dabei werden die verschiedenen Hämoglobinvarianten in gleichem Ausmaß glykiert 30 wie das normale HbA₀ (J. Sosenko et al., Diabetes Care 3 (1980), 590 - 593).

- Die Konzentration der glykierten Hämoglobine im Blut ist abhängig von der Blutglucosekonzentration. Der Anteil der glykierten Hämoglobine am Gesamthämoglobin liegt bei Erwachsenen normalerweise im Bereich von 3 - 6 %. Bei erhöhtem Blutzuckerspiegel nimmt dieser Anteil bis auf 15 % zu. Die Bestimmung des Anteils an N-terminal glykiertem Hämoglobin ist daher ein zuverlässiger Parameter zur Kontrolle des Blutglucosespiegels. Da die Erythrozyten eine durchschnittliche Halbwertszeit von 120 Tagen aufweisen, 35 bietet die Bestimmung von glykiertem Hämoglobin im Blut einen Parameter für den Blutglucosespiegel, der unabhängig von einer kurzzeitigen Erhöhung, z.B. nach einer kohlehydratreichen Mahlzeit, ist.

- Die Bestimmung der glykierten Hämoglobine im Blut ist daher von großer Bedeutung für die Diagnose und Überwachung eines Diabetes mellitus. Es sind daher eine Reihe von chromatographischen und 40 elektrophoretischen Methoden zum Nachweis von HbA_{1c} entwickelt worden. Die glykierten Hämoglobinvarianten lassen sich mit diesen Methoden dagegen nicht simultan mit HbA_{1c} bestimmen (J. Sosenko et al., Diabetes Care 3 (1980), 590 - 593, D. Goldstein et al., CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 21 (1984), 187 - 225 und Allen et al., Annual Clinical Biochemistry 29 (1992), 426 - 429). Mit Hilfe der affinitätschromatographischen Methoden werden zwar auch die glykierten Hämoglobinvarianten wie HbS_{1c} 45 oder HbC_{1c} neben HbA_{1c} simultan bestimmt, doch ist diese Methode nicht spezifisch für die Glykierung am N-Terminus der β -Kette, da alle Glykierungen des Hämoglobinmoleküls (z.B. an Lysin-Resten oder an der α -Kette) gleich erfaßt werden (D. Goldstein et al., CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 21 (1984), 187 - 225). Dadurch ergeben die chromatographischen Verfahren bei einem Patienten mit einer der oben genannten Hämoglobinopathien zu geringe Werte für den Anteil an N-terminal glykiertem Hämoglobin, 50 während die affinitätschromatographischen Methoden allgemein höher messen. Daher sind diese bekannten Verfahren zur Diagnose und Überwachung eines Diabetes mellitus bei Blutproben von Patienten mit Hämoglobinopathien nicht anwendbar.

- Es hat sich jetzt überraschenderweise gezeigt, daß mit Antikörpern, die erhältlich sind durch Immunisierung mit einem Immunogen, welches als Haptenteil das glykierte Oligopeptid Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro 55 oder einen Teil davon enthält, Antikörper erhalten werden, die HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennen und für die Verwendung in immunologischen Bestimmungsverfahren für HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} geeignet sind.

Gegenstand der Erfindung ist demnach die Verwendung von Antikörpern, die HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennen und erhältlich sind durch Immunisierung mit mindestens einem Immunogen, welches als Hapten-

teil das glykierte Oligopeptid Fructose-Val-His, Fructose-Val-His-Leu, Fructose-Val-His-Leu-Thr und/oder Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro enthält zur immunologischen, simultanen Bestimmung von HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c}.

- 5 Daß derartig hergestellte Antikörper HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennen, ist insbesondere auch deshalb überraschend, weil der Aminosäureaustausch in Position 6 der β -Kette von HbS und HbC auch zu einer Änderung der Tertiärstruktur im Bereich des vom Antikörper erkannten Epitops führt und demzufolge zu erwarten gewesen wäre, daß Antikörper, die mit dem oben genannten Immunogen erhalten werden, HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} differenzieren.

- 10 Mit diesen Antikörpern kann die simultane immunologische Bestimmung von N-terminal glykiertem Hämoglobin HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} über alle gängigen Immunoassays wie z.B. ELISA, Fluoreszenzimmunoassay, Radioimmunoassay, Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (FPIA), Cloned Enzyme Donor Immunoassay (CEDIA) oder Enzyme-Multiplied-Immunoassay-Technique (EMIT) erfolgen. Der Test kann dabei sowohl als homogener Test, z.B. als ein kompetitiver turbidimetrischer Immunoassay, als auch als heterogener Test durchgeführt werden.

- 15 Vorzugsweise erfolgt der Test nach dem Prinzip des Agglutinationstests, wie z.B. TINIA oder dem Latex Particle-Enhanced Immunoassay (LPIA). Hierbei handelt es sich um einen kompetitiven Test, bei welchem das Antigen aus der Probe mit einem Polyhaptan, in dem mehrere Haptene an ein hochmolekulares Trägerprotein gebunden vorliegen, um die Bindung an einen spezifischen Antikörper konkurriert. Vorzugsweise wird als Hapten, das an einen hochmolekularen Träger gebunden vorliegt, das zur Immunisierung verwendete Hapten (vorzugsweise Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro) verwendet. In Abwesenheit von Antigen aus der Probe wird dieses Immunogen durch den im Test eingesetzten Antikörper zu großen Aggregaten vernetzt, welche eine bestimmte Trübung dieser Testlösung verursachen. Entsprechend der Menge an Antigen in der Probe wird hochmolekulares Polyhaptan aus diesen Aggregaten durch das Antigen verdrängt. Damit nimmt die Trübung in einer zur Antigenmenge proportionalen Weise ab. Durch Vergleich mit der Trübungsabnahme, die bei Zugabe bekannter Mengen an glykiertem Hämoglobin beobachtet wird, kann die Menge an glykiertem Hämoglobin (HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c}) in der Probelösung bestimmt werden. Als Standard können dabei HbA_{1c}, HbS_{1c} oder HbC_{1c} allein oder als Gemische verwendet werden.

Weiterhin bevorzugt ist die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens nach dem Prinzip des CEDIA, EMIT, FPIA oder ELISA.

- 30 Beim CEDIA-Prinzip bewirkt das Antigen aus der zu analysierenden Probe die Assoziation von allein jeweils inaktivem Enzymakzeptor und Enzymdonor zu einem aktiven Enzym, dessen Aktivität somit proportional zur Menge an Antigen in der zu analysierenden Probe ist (Henderson et al., Clinical Chemistry 32 (1986), 1637 - 1641). Zum Nachweis werden hierbei bestimmte Enzyme wie z.B. die β -Galactosidase verwendet, die in zwei jeweils enzymatisch inaktiven Bestandteilen, nämlich einem großen Polypeptid (Enzymakzeptor) und einem kleinen Polypeptid (Enzymdonor) vorliegen, wobei diese Bestandteile spontan zu einem enzymatisch aktiven Protein assoziieren. An den Enzymdonor wird das als Analyt nachzuweisende Hapten derart gebunden, daß die Assoziation des Enzymdonors mit dem Enzymakzeptor zum aktiven Enzym durch diese Bindung nicht verhindert wird. Diese Assoziation wird aber dann gehemmt, wenn an den Antigen-Enzymdonor-Komplex ein Antikörper gegen das Antigen bindet. In einer Reagenzlösung, in der 40 Enzymakzeptor, Antigen-Enzymdonor-Komplex und der entsprechende Antikörper vorliegen, kann daher kein aktives Enzym gebildet werden und es wird keine enzymatische Aktivität gemessen. Nach Zugabe der Probelösung verdrängt nun das Antigen aus dieser Probelösung den Antikörper aus der Bindung an den Antigen-Enzymdonor-Komplex und ermöglicht so die Ausbildung des aktiven Enzyms.

- Bei der Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT) wird das nachzuweisende Hapten so 45 kovalent mit dem Markerenzym gekoppelt, daß die Enzymaktivität erhalten bleibt. Nach Bindung eines Antikörpers an den Haptenanteil wird die Substratbindung an das Enzym sterisch jedoch behindert, so daß keine enzymatische Umsetzung des Substrats erfolgen kann. Wie beim CEDIA-Prinzip verdrängt dann auch hier das Antigen aus der zu bestimmenden Probelösung den Antikörper vom enzymgebundenen Hapten und ermöglicht so eine enzymatische Aktivität, die proportional zur Konzentration des zu analysierenden 50 Antigens in der Probelösung ist (Gunzer et al., Kontakte III, 1980, 3 - 11 und K. Rubenstein, Biochemical and Biophysical Research Communications 47 (1972), 846 - 851).

- Beim Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (FPIA) wird das zu bestimmende Hapten mit einer fluoreszierenden Substanz markiert. Diese Moleküle absorbieren Lichtenergie und geben sie in einem Zeitraum von etwa 10^{-8} sec als Licht längerer Wellenlänge wieder ab. Wird der Fluorophor durch 55 polarisiertes Licht angeregt, so hängt der Polarisationsgrad des emittierten Lichts von der Rotationsgeschwindigkeit des Tracers (Analyt-Fluorophor-Konjugat) ab. Die Bindung des Tracers an einen Antikörper behindert die Rotation des Fluorophors. Der freie Tracer rotiert schneller und depolarisiert das anregende Licht mehr als der größere, trägere Antikörper-Tracer-Komplex. Je mehr der Analyt in der Probe vorhanden

ist, desto weniger Antikörper-Tracer-Komplexe entstehen und desto weniger Fluoreszenzpolarisation ist meßbar (W. Dandliker et al., Journal of Exp. Med. 122 (1965), 1029).

Bei Immunoassays nach dem ELISA-Prinzip wird die Bindung eines enzymmarkierten Antikörpers an ein vor oder während der Nachweisreaktion immobilisiertes Antigen aus der zu bestimmenden Probelösung über die Messung der Enzymmarkierung in der festen Phase bestimmt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind monoklonale und polyklonale Antikörper, die HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennen und erhältlich sind durch Immunisierung mit einem Immunogen, das als Hapten das glykierte Oligopeptid Fructose-Val-His, Fructose-Val-His-Leu oder Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro enthält, und Isolierung des Antikörpers aus dem Serum der immunisierten Tiere nach bekannten Verfahren.

Ein weiterer Gegenstand sind monoklonale und polyklonale Antikörper, erhältlich durch Immunisierung eines Säugers mit einem Gemisch aus einem Immunogen, das als Hapten Fructose-Val-His-Leu-Thr enthält und mindestens einem weiteren Immunogen, welches als Haptenteil Fructose-Val-His, Fructose-Val-His-Leu und/oder Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro enthält, und Isolierung des Antikörpers aus dem Serum der immunisierten Tiere.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind monoklonale Antikörper, die HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennen und erhältlich sind durch Immunisierung mit dem genannten Immunogen, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Klonierung derjenigen immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, und Isolierung des Antikörpers aus den Antikörper produzierenden Zellen nach bekannten Verfahren.

Das Immunogen kann analog den in EP-A 0 329 994 (die Gegenstand der Offenbarung der vorliegenden Patentanmeldung ist) beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Das Hapten wird dabei an ein Trägerprotein wie z.B. KLH (keyhole limpet hemocyanin), β -Galactosidase oder Edestin gebunden. Vorzugsweise wird KLH als Trägerprotein verwendet. Die Kopplung zwischen Hapten und Trägerprotein erfolgt zweckmäßig über Kopplungsgruppen wie z.B. Lysin, Cystein und die Maleinimidohexylgruppe.

Besonders bevorzugt wird ein Immunogen verwendet, welches eine hohe Beladungsdichte aufweist (Anzahl der gebundenen Haptengruppen entsprechend 5 - 25 % des Gewichts des Trägerproteins). Dabei wird ein Antiserum hoher Serumstärke erhalten. Unter einer hohen Serumstärke ist zu verstehen, daß das erhaltene polyklonale Antiserum im Reagenz zur Bestimmung der glykierten Hämoglobine in hohen Verdünnungen (1:8, vorzugsweise 1:10 und mehr) eingesetzt werden kann.

Mit diesem Immunogen werden dann die üblicherweise zur Gewinnung von Antikörpern verwendeten Tiere nach dem Fachmann bekannten Verfahren immunisiert. Vorzugsweise werden Kaninchen oder Schafe bzw. zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern Mäuse verwendet. Die polyklonalen Antikörper können entweder direkt oder vorzugsweise nach chromatographischer Reinigung an DEAE oder immunsorptiver Reinigung verwendet werden. Monoklonale Antikörper werden in üblicher Weise durch Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Klonierung derjenigen immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, und Isolierung des Antikörpers nach bekannten Verfahren erhalten.

Ebenso ist es bevorzugt, zur Immunisierung ein Gemisch von mindestens zwei Immunogenen zu verwenden, die als Haptenteil Fructose-Val-His, Fructose-Val-His-Leu, Fructose-Val-His-Leu-Thr und Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro enthalten.

Diejenigen immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, werden in üblicher Weise über einen ELISA-Test zum Nachweis der Bindung an HbA_{1c}, HbS_{1c} und gegebenenfalls HbC_{1c} identifiziert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, die sowohl HbA_{1c} als auch HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennen, durch Immunisierung mit einem Immunogen, das als Hapten das glykierte Oligopeptid Fructose-Val-His, Fructose-Val-His-Leu oder Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro enthält, oder einem Gemisch von mindestens zwei solchen Immunogenen, und Isolierung des Antikörpers aus dem Serum der immunisierten Tiere nach bekannten Verfahren.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennen, durch Immunisierung mit einem Immunogen, das als Hapten das glykierte Oligopeptid Fructose-Val-His, Fructose-Val-His-Leu oder Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro enthält, oder einem Gemisch von mindestens zwei solchen Immunogenen, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Klonierung derjenigen immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper produzieren, und Isolierung des Antikörpers aus den klonierten Zellen nach bekannten Verfahren.

Ein besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist ein solches erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung von polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern, die HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennen, bei welchem ein Immunogen verwendet wird, bei dem der Haptenteil an KLH als Trägerprotein gebunden ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Antikörpers zur immunologischen Bestimmung des Gehaltes an glykiertem Hämoglobin in einem Verfahren zur simultanen

immunologischen Bestimmung des Gehaltes an HbA_{1c}, sowie glykierten Hämoglobinvarianten wie z.B. HbS_{1c} und HbC_{1c} in einer Blutprobe.

Die erfindungsgemäßen Antikörper erkennen zusätzlich noch weitere Glykierungsvarianten von Hb wie z.B. HbA_{21c} und HbE_{1c}.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenz zur immunologischen Bestimmung des Gehaltes an N-terminal glykiertem Hämoglobin, welcher mindestens einen erfindungsgemäßen Antikörper enthält, sowie ein Verfahren zur immunologischen, simultanen Bestimmung von HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} unter Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

10

Beispiel 1:

Herstellung von Immunogenen zur Gewinnung von Antikörpern gegen glykierte Hämoglobine vom HbA_{1c}-Typ

15

1.1 Verwendung von β -Galactosidase als Trägerprotein

Das Peptid Fructose-Val-His-Leu-Thr-Lys-OH wird gemäß den Angaben in EP-A 0 329 994 über eine Festphasensynthese an einem semiautomatischen Peptidsynthesizer der Firm Labortec (Bubendorf, Schweiz) synthetisiert und an β -Galactosidase gebunden. Dazu werden 10 mg Fructose-Val-His-Leu-Thr-Lys-OH in 1 ml 0,1 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7 aufgenommen und 6,2 mg Maleinimidohexansäure-N-hydroxysuccinimidester in 2 ml Ethanol zugegeben. Die Reaktionslösung wird 14 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend an Polycosil C18 aufgereinigt und die gemäß HPLC reinen Fraktionen lyophilisiert.

25

Zur Herstellung des Immunogens werden 48 mg β -Galactosidase (β -Gal) (EIA-Qualität, Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 570 079) unter Argonatmosphäre in 2 ml mit Argon-begastem 0,1 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 gelöst und unter Sauerstoffausschluß 5 mg des lyophilisierten Peptids Fructose-Val-His-Leu-Thr-Lys(MH)-OH zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die gesamte Reaktionslösung auf eine AcA202-Säule (2 x 24 cm, Pharmacia, Schweden), welche mit Argon-gesättigter 0,09%iger Natriumchloridlösung equilibriert wurde, aufgetragen. Anschließend wird mit dem gleichen Equilibrierungspuffer eluiert und die Proteinfractionen, die das gewünschte Immunogen enthalten, gesammelt. Die Beladung der β -Galactosidase mit den Haptengruppen kann durch Umsetzung einer Probe mit Ellmanns Reagenz bestimmt werden.

30

In analoger Weise werden die Immunogene Fructose-Val-His-Lys-(MH)- β Gal, Fructose-Val-His-Leu-Lys-(MH)- β Gal und Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro-Lys-(MH)- β Gal hergestellt.

35

1.2 Verwendung von KLH als Trägerprotein

Das Hapten Fructose-Val-His-Leu-Thr-Cys-OH wird gemäß den Angaben in EP-A 0 329 994 über eine Festphasensynthese an einem semiautomatischen Peptidsynthesizer der Firm Labortec (Bubendorf, Schweiz) synthetisiert.

Das Trägerprotein Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH) wird mit Maleinimidohexanoyl-N-hydroxysuccinimid (MHS) umgesetzt. Dazu werden 2 g KLH in 70 ml 0,1 mol/l Natriumhydrogencarbonat pH 8,35 gelöst. Der unlösliche Proteinanteil wird durch Zentrifugation abgetrennt. Anschließend wird der pH Wert der Lösung mit 0,1 mol/l NaOH auf pH 8,30 eingestellt. Zu dieser Proteinlösung gibt man 370 mg Maleinimidohexanoyl-N-hydroxysuccinimid gelöst in 3 ml DMSO. Nach 15 minütiger Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird der pH Wert mit 0,1 mol/l HCl auf pH 7,0 eingestellt und das Produkt über eine Gelpermeationschromatographie an Ultrogel AcA 202 (2 x 24 cm, Pharmacia, Schweden) aufgereinigt. Die Bestimmung der Anzahl an Maleinimidohexanoylgruppen im erhaltenen Produkt erfolgt gemäß EP-A 0 329 994 (Beispiel 4) mit Ellmann's Reagenz. In der Regel wird eine Beladung von 600 - 900 Maleinimidohexanoylgruppen je mol KLH erreicht.

45

Das so erhaltene KLH-Derivat wird ca. 15 min mit Argon gespült. Anschließend wird je mol Maleinimidohexanoylgruppe 2 mol des Peptid-Haptens zugegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufreinigung erfolgt dann durch Abtrennung des nicht umgesetzten Peptids durch Gelpermeationschromatographie an Ultrogel AcA 202 (2 x 24 cm, Pharmacia, Schweden).

55

Beispiel 2:

Herstellung von polyklonalen Antiseren gegen HbA_{1c}

5 **2.1 Immunisierung**

5 Schafe werden mit dem gemäß Beispiel 1.1 hergestellten Immunogen in Freund'schem Adjuvans immunisiert. Die Dosis beträgt jeweils 500 µg je Tier für die erste und jede weitere Folgeimmunisierung. 5 weitere Schafe wurden in derselben Weise immunisiert, jedoch mit jeweils 1 mg Immunogen je Tier und
10 Immunisierung.

10 Schafe werden mit einem analogen Immunogen, bei dem das Hapten jedoch an KLH gebunden vorliegt (Herstellung gemäß Beispiel 1.2) in derselben Weise ebenfalls mit 500 µg bzw. 1 mg je Tier und Immunisierung immunisiert.

Nach 5 Monaten (KLH-Immunogen) bzw. 6 Monaten (β-Gal-Immunogen) werden allen Tieren Serumproben entnommen und die Serumstärke der erhaltenen Antiseren über einen Trübungstest bestimmt.
15

Antiserumprüfung

Verwendete Reagenzien:

20

Hämolysereagenz:

20 mM MES pH 6,0

1 % SDS

25 0,02 % Kaliumhexacyanoferrat (III)

0,1 % NaN₃

0,5 % Brij 35

Reaktionspuffer:

30

20 mM MES pH 6,0

150 mM NaCl

0,5 % Brij 35

0,1 % NaN₃

35 3 % PEG 6000

Polyhaptenlösung:

20 mM MES pH 6,0

40 150 mM NaCl

0,5 % Brij 35

0,1 % NaN₃

6 % PEG 6000

0,1 % RSA

45 Polyhapten 30 µg/ml

Vorbereitung der Antiseren zur Messung

Die Seren werden 1+1 mit doppelt konzentriertem Reaktionspuffer verdünnt, bei 4°C über Nacht
50 inkubiert und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wird 1 Stunde lang im Eisbad inkubiert, durch einen 0,22 µm-Filter filtriert und der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Die so entstandene Antikörperlösung kann direkt in den Test eingesetzt werden oder mit Reaktionspuffer weiter verdünnt werden.

55 Messung

Zur Beurteilung der Antiserumstärke wird Antikörperlösung und Polyhaptenlösung gemischt und die entstehende Trübung photometrisch gemessen. Die Messung wird bei 37°C am Analysenautomaten Hitachi

EP 0 598 329 A2

704 durchgeführt. Der Ablauf ist wie folgt:

8 µl Hämolyseagenz und 350 µl Antikörperlösung werden gemischt und 5 min lang inkubiert. Anschließend werden 70 µl Polyhaptenlösung hinzugefügt und weitere 5 min inkubiert. Die in dieser Zeit entstehende Trübung wird bei 340 nm (unter Verwendung der Referenzwellenlänge 700 nm) als Extinktion gemessen.

2.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 (β -Gal-Immunogen) und 2 (KLH-Immunogen) zusammengefaßt.

Bei niedrigen Antiserenverdünnungen (1:2 / 1:4) zeigen viele Tiere Meßsignale von 500 mE und mehr. Bei Antiserenverdünnung 1:8 trifft dies nur noch für ein Tier aus der β -Gal-Immunisierung zu, während es bei der Immunisierung mit KLH 8 Tiere sind. Die meisten dieser Seren erzeugen auch in dieser Verdünnung noch sehr hohe Meßsignale und lassen sich offensichtlich noch in hohen Verdünnungen zur Messung der glykierten Hämoglobine einsetzen. Die zur Immunisierung verwendete Dosis des Immunogens zeigt keinen erkennbaren Einfluß auf die Serumstärke.

Tabelle 1

Maximales Meßsignal im kompetitiven Immunoassay bei Verwendung eines polyklonalen Antiserums, das durch Immunisierung mit einem an β -Galactosidase gebundenen Peptid-Hapten erhalten wurde				
Tier	Dosis des Immunogens (mg)	Meßsignal mE bei Antiserumverdünnung 1:2	Meßsignal mE bei Antiserumverdünnung 1:4	Meßsignal mE bei Antiserumverdünnung 1:8
1	1,0	435	12	0
2	1,0	1261	309	0
3	1,0	77	2	0
4	1,0	205	2	0
5	1,0	887	305	4
6	0,5	1000	417	67
7	0,5	1289	992	650
8	0,5	1100	239	0
9	0,5	848	253	0
10	0,5	228	3	2

Tabelle 2

Maximales Meßsignal im kompetitiven Immunoassay bei Verwendung eines polyklonalen Antiserums, das durch Immunisierung mit einem an KLH gebundenen Peptid-Hapten erhalten wurde				
Tier	Dosis des Immunogens (mg)	Messignal mE bei Antiserumverdünnung 1:2	Messignal mE bei Antiserumverdünnung 1:4	Messignal mE bei Antiserumverdünnung 1:8
11	1,0	1580	1591	1575
12	1,0	1094	532	99
13	1,0	1044	844	356
14	1,0	1306	1548	1619
15	1,0	1620	1707	1696
16	0,5	1194	973	572
17	0,5	1435	1531	1394
18	0,5	1467	1598	1444
19	0,5	1158	1301	630
20	0,5	1486	1575	1608

Beispiel 3:**Isolierung von HbA₀ und HbS₀ und in vitro Glykierung von HbS₀ zu HbS_{1c}**

Kommerziell erhältliches HbS (Sigma, Kat.-Nr. H0392) bzw. humanes Erythrozyten-Hämolysat wird chromatographisch getrennt und das so aufgereinigte HbS₀ in vitro mit Glucose zu HbS_{1c} umgesetzt.

3.1. Isolierung von HbS₀

Ein HbS-Präparat der Fa. Sigma wurde in 50 mmol/l MES pH 6,2 gelöst und anschließend gegen denselben Puffer 12 Stunden dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine mit dem obigen Puffer equilibrierte S-Sepharose HP Chromatographie-Säule der Fa. Pharmacia aufgetragen. Die Elution erfolgte durch einen LiCl-Gradienten. Die HbS₀-Fraktion wurde isoliert. Sie enthielt keine glykierten Hämoglobine, wie mittels HPLC-Analytik unter Verwendung einer MonoS_{H b A 1 c}-Säule der Fa. Pharmacia und deren Vorschrift zur Bestimmung von HbA_{1c} gezeigt werden konnte.

3.2. Herstellung von glykiertem HbS

Ein Teil der HbS₀-Fraktion wurde gegen einen 100 mmol/l Phosphat-Puffer pH 6,5 dialysiert und anschließend mit einem 2600-fachen molaren Überschuß an Glucose umgesetzt. Nach 20 Stunden bei 37 °C wurde die Reaktion abgebrochen und der Inkubationsansatz zur Entfernung der Glucose ausgiebig dialysiert. Das Dialysat wurde ebenfalls mittels HPLC analysiert. Das Chromatogramm wies einen Anteil von 11,1 % glykiertem HbS auf.

3.3. Isolierung von HbA₀

Durch Lyse von PBS gewaschenen Human-Erythrocyten in dest. Wasser wurden die enthaltenen Hämoglobine freigesetzt. Zelltrümmer und Erythrocyten-Ghosts wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Das so erhaltene Hämolysat wurde gegen 50 mM MES pH 6,2 dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend auf eine mit dem obigen Puffer equilibrierte S-Sepharose HP Chromatographie-Säule der Fa. Pharmacia aufgetragen. Die Elution erfolgte durch einen LiCl-Gradienten. Die HbA₀-Fraktion wurde isoliert. Sie enthielt keine glykierten Hämoglobine, wie mittels HPLC-Analytik unter Verwendung einer MonoS_{H b A 1 c}-Säule der Fa. Pharmacia und deren Vorschrift zur Bestimmung von HbA_{1c} gezeigt werden konnte.

B Ispl 14:**Simultane Bestimmung von HbA_{1c} und HbS_{1c}**

Die Vollblut-Proben wurden zuerst mit einem speziellen Hämolyseagensatz hämolytisiert und anschließend an einem Photometer (BM/Hitachi 717 der Fa. Boehringer Mannheim GmbH) im Zweikanalverfahren vermessen. Im einen Kanal erfolgte der immunologische Nachweis von HbA_{1c} in g/dl nach dem TINIA-Testprinzip durch turbidimetrische Messung bei 340 nm, während im anderen Kanal der Gesamthämoglobingehalt durch photometrische Messung bei 570 nm bestimmt wurde. Der prozentuale Gehalt an HbA_{1c} wird nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ HbA}_{1c} = \frac{\text{HbA}_{1c} \text{ [g/dl]}}{\text{Gesamthämoglobin [g/dl]}} \times 100$$

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

- 1) Hämolyseagensatz:
20 mM Natriumphosphat pH 7,4
0,9 % TTAB (Tetradecyltrimethylammoniumbromid)
- 2) Antikörperlösung (R1 - HbA_{1c}):
20 mmol MES-Puffer pH 6,2 (2-(N-Morpholino)-ethan-15
150 mmol NaCl sulfonsäure)
3,0 % PEG 6000 (Polyethylenglycol MG ca. 6000)
0,5 % Brij® 35
- 1,0 mg/ml PAK <HbA_{1c}>-S-IgG(DE) (polyklonale Schafantikörper gegen HbA_{1c}), hergestellt mit Immuno-
gen Fructose-Val-His-Leu-Thr-MH-βGal
- 3) Polyhaptenslösung (R2 - HbA_{1c}):
20 mmol MES-Puffer pH 6,2
150 mmol NaCl
- 6,0 % PEG 6000
- 0,5 % Brij® 35
- 30 µg/ml Polyhaptens¹⁾
- 4) Pufferlösung zur Gesamthämoglobinsbestimmung (R1 - Hb):
20 mM Natriumphosphat pH 7,4
- 150 mMol NaCl
- 5) Kalibratoren a - e:
20 mmol Natriumphosphat pH 7,4
0,9 % TTAB
1,4 mg/ml Schafhämoglobin
- 0, 0,05, 0,1, 0,16, 0,3 humanes HbA_{1c}

4.1. Bestimmung von HbA_{1c}

Zur Probe wurde das Hämolyseagensatz in einem Verhältnis von 1 + 100 hinzugefügt und bei 25 °C ca. 5 Minuten inkubiert. Zu 10 µl hämolytisierten Probe wurden 250 µl Antikörperlösung (R1 - HbA_{1c}) hinzupipettiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde der Probenleerwert bei 700/340 nm bichromatisch gemessen (E1). Ca. 20 sec nach der Messung wurden 50 µl Polyhaptenslösung zugegeben, sofort gerührt und weitere 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wird die Trübung bei 700/340 nm bichromatisch gemessen (E2).

¹⁾ Polyhaptens: Fructose-Val-His-Leu-Thr, gekoppelt über Cys-Maleinimidohexansäure an Dextran wie in der deutschen Patentanmeldung P 41 40 142.5 beschrieben.

Die probenspezifische Extinktionsdifferenz wird nach der Formel

$$\Delta E = E_2 - K \cdot E_1$$

5 berechnet, wobei K den Volumenkorrekturfaktor darstellt.

$$K = \frac{V_{Probe} + V_{R1}}{V_{Gesamt}}$$

15 Mit Hilfe der Kalibratoren a - e, die aufsteigende Konzentrationen an HbA_{1c} enthalten, wurde eine Eichkurve erstellt und über die probenspezifische Extinktionsdifferenz ΔE kann die unbekannte HbA_{1c}-Konzentration der Probe in g/dl abgelesen werden.

4.2. Bestimmung der Gesamthämoglobinkonzentration

20 Zur Bestimmung der Gesamthämoglobinkonzentration wird das in 4.1. erhaltene Hämolytats eingesetzt. Durch die im Hämolyse-Reagenz enthaltenen Reagenzien wird das Hämoglobin oxidiert und durch Anlagerung des Detergenzmoleküls ein charakteristisches Hämoglobinchromophor enthalten. 20 µl dieses Hämolytats werden zusammen mit 230 µl Puffer (R1 - Hb) in die Küvette pipettiert, kurz gerührt und nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C die Extinktion bichromatisch bei 660/570 nm gemessen. Mit Hilfe des
25 Kalibrators a und phys. NaCl-Lösung (Nullstandard) wird eine Eichkurve erstellt und über die Extinktion der unbekannten Probe die Konzentration abgelesen.

Der prozentuale HbA_{1c}-Gehalt wird über die Formel

$$30 \quad \% \text{ HbA}_{1c} = \frac{\text{HbA}_{1c} \text{ [g/dl]}}{\text{Hb [g/dl]}} \times 100$$

35 berechnet.

Beispiel 5:

40 Bestimmung der Spezifität der erfindungsgemäßen Antikörper

Zur Bestimmung der Spezifität der gemäß Beispiel 2 erhaltenen Antikörper wird die HbA_{1c}-Bestimmung gemäß Beispiel 4 am Hitachi 717 durchgeführt. Hierzu werden HbA₀ (nach Beispiel 3 aus Humanblut aufgereinigt), HbS₀ (Sigma H0392 gemäß Beispiel 3 aufgereinigt), HbS_{1c}-haltige Probe (in vitro gemäß
45 Beispiel 3 hergestellt) und zwei Vollblutkontrollen mit bekannten HbA_{1c}-Werten (BioRad, Lyphochek® Diabetes Control Level 1 and 2, Best.-Nr. 740) als Proben vermessen. Das Ergebnis ist in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3

Probe	HbA _{1c} /HbS _{1c} [g/dl]	Hb [g/dl]	HbA _{1c} /HbS _{1c} [%]
HbA ₀	0	20	0
HbS ₀	0	13.9	0
55 HbS ₀ + HbS _{1c} (HPLC: 11.1 %)	1.33	12.3	10.8
Lyphochek Level 1 (Sollwert 5.6 %)	0.75	14.3	5.2
Lyphochek Level 2 (Sollwert 10.4 %)	0.98	9.1	10.8

Hieraus ergibt sich, daß die erfindungsgemäßen Antikörper sowohl HbA_{1c} als auch HbS_{1c} erkennen, nicht aber die entsprechenden nicht-glykierten Hämoglobine HbA₀ bzw. HbS₀.

Beispiel 6:

Simultane Bestimmung von HbA_{1c} und HbS_{1c} in einer heterozygoten HbAS-Probe

Die heterozygote HbAS-Probe (30 % HbS) wurde analog Beispiel 4 am Hitachi 717 vermessen. Vergleichend wurde der HbA_{1c}-Gehalt mit einer hoch auflösenden HPLC-Methode nach Bissé E., Wieland H., J. Chromatogr. 434, 1988, 95 - 110 (Elutionsprofil siehe Figur 1) und der Glykohämoglobin-Gehalt mit der Affinitätschromatographischen Bestimmungsmethode Glyc-Affin der Firma IsoLab (Best.-Nr. SG 6200) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 Zusammengefaßt:

Tabelle 4

	HbA _{1c}	HbS _{1c}	HbA _{1c} + HbS _{1c}
Immunoassay	-	-	5,6 %
HPLC	3,3 %	-	-
Glyc-Affin	-	-	5,4 %

Mit der HPLC-Methode nach Bissé und Wieland wird ein HbA_{1c}-Wert von 3,3 % gemessen. Der Wert für glykiertes HbS (HbS_{1c}) kann nicht angegeben werden, da die Elutionszeit des HbS_{1c}-Peaks nicht exakt bekannt ist. Es könnte sich um einen der Peaks bei 31 - 33 Minuten Elutionszeit handeln.

Durch die Erfassung von HbS_{1c} mißt die Tinaquant-Test um 2,3 % höher als die HPLC-Methode. Mit der Affinitätschromatographischen Methode (Erfassung von Glykohämoglobin = HbA_{1c} + HbS_{1c} + HbA_{1a} + HbA_{1b} + ε-Lysin-glyk. Hb) werden 7,25 % Glykohämoglobin gemessen. Aufgrund der Miterfassung dieser weiteren glykierten Hämoglobinspezies mißt der Glyc-Affin-Test höher als der beschriebene immunologische Test. Im Methodenvergleich mit normalen Proben zwischen Tinaquant und Glyc-Affin ergibt sich deshalb eine Ausgleichsgerade von

$$\% \text{ HbA}_{1c} (\text{Immunoassay}) = 0,66 \times \% \text{ Glykohämoglobin (Affinitätschromatographie)} + 0,6$$

mit einer sehr guten Korrelation (Figur 2). Wird nun der Glyc-Affin-Wert mit Hilfe der Formel der Ausgleichsgeraden um die Erfassung von HbA_{1a}, HbA_{1b} etc. korrigiert, dann ergibt sich ein nahezu identischer Meßwert für HbA_{1c} + HbS_{1c} mit dem Immunoassay.

Patentansprüche

1. Verwendung von Antikörpern, die HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennen und erhältlich sind durch Immunisierung mit mindestens einem Immunogen, welches als Haptenteil das glykierte Oligopeptid Fructose-Val-His, Fructose-Val-His-Leu, Fructose-Val-His-Leu-Thr und/oder Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro enthält, zur immunologischen, simultanen Bestimmung von HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c}.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die immunologische Bestimmung nach dem Prinzip des Agglutinationstests oder nach dem CEDIA-, EMIT-, FPIA- oder ELISA-Prinzip erfolgt.
3. Antikörper, der HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennt und erhältlich ist durch Immunisierung eines Säugers mit einem Immunogen, das als Haptenteil das glykierte Oligopeptid Fructose-Val-His, Fructose-Val-His-Leu und/oder Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro enthält, und Isolierung des Antikörpers aus dem Serum der immunisierten Tiere.
4. Antikörper, der HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennt und erhältlich ist durch Immunisierung eines Säugers mit einem Gemisch aus einem Immunogen, das als Hapten Fructose-Val-His-Leu-Thr enthält und mindestens einem weiteren Immunogen, welches als Haptenteil Fructose-Val-His, Fructose-Val-His-Leu und/oder Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro enthält, und Isolierung des Antikörpers aus dem Serum der immunisierten Tiere.

5. Antikörper nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß er ein monoklonaler Antikörper ist und erhältlich ist durch Immunisierung mit einem der in Anspruch 3 oder 4 genannten Immunogene, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere, Klonierung derjenigen immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper produzieren und Isolierung des Antikörpers nach bekannten Verfahren.
- 5 6. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, die HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennen, durch Immunisierung eines Säugers mit einem Immunogen, das als Haptenteil das glykierte Oligopeptid Fructose-Val-His, Fructose-Val-His-Leu oder Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro enthält, oder einem Gemisch von zwei solchen Immunogenen und Isolierung des Antikörpers aus dem Serum der immunisierten Tiere.
- 10 7. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} erkennen, durch Immunisierung eines Säugers mit einem Immunogen, das als Haptenteil das glykierte Oligopeptid Fructose-Val-His-, Fructose-Val-His-Leu oder Fructose-Val-His-Leu-Thr-Pro enthält, oder mit einem Gemisch von zwei solchen Immunogenen, Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere,
- 15 8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein Immunogen verwendet wird, bei dem der Haptenteil an KLH als Trägerprotein gebunden ist.
- 20 9. Verwendung eines Antikörpers gemäß Anspruch 3 bis 5 zur immunologischen Bestimmung des Gehaltes an N-terminal glykiertem Hämoglobin in einem Verfahren zur simultanen Bestimmung des Gehaltes an HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} in Blutproben.
- 25 10. Reagenz zur immunologischen Bestimmung von N-terminal glykiertem Hämoglobin, enthaltend mindestens einen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5.
- 30 11. Verfahren zur immunologischen, simultanen Bestimmung von HbA_{1c}, HbS_{1c} und HbC_{1c} unter Verwendung von Antikörpern nach den Ansprüchen 3 bis 5.